Zur Antikörperbildungsfähigkeit dysgammaglobulinämischer Hühner

Wiebke Hartmann

1971

Aus dem Institut für Tierphysiologie und dem Institut
für Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstände: Professor DDr. DDr. h.c. Johannes Brüggemann
Professor Dr. Dr. Jürgen Tiews

Zur Antikörperbildungsfähigkeit dysgammaglobulinämischer Hühner

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität
München

von

W i e b k e H a r t m a n n

aus
Ludwigsburg

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen

Fakultät der Universität München

Dekan: Professor Dr. B.Vollmerhaus

Referent: Professor DDr. DDr. J. Brüggemann

Korreferent: Professor Dr. A. Mayr

Tag der Promotion: 5. Februar 1971

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	3
II. Material und Methoden	8
1. Tiermaterial, Haltung und Fütterung	8
2. Immunisierung	9
3. Serumgewinnung	10
4. Antiserumgewinnung	10
5. Nachweis-Methoden	12
a) Immunelektrophorese	12
b) Einfache radiale Immundiffusion	14
c) Zweidimensionale Immundiffusion	16
d) Farr-Technik (Antigen-Binding-Capacity)	17
e) Radioimmunelektrophorese	21
III. Ergebnisse	25
1. Aufschlüsselung des Tiermaterials nach dem Immunglobulinstatus	25
2. Präzipitinbildung	26
3. Antigenbindungsfähigkeit	28
4. Differenzierung der Antikörperaktivität enthaltenden Immunglobuline	29
IV. Diskussion	32
V. Zusammenfassung	40

I. Einleitung

Bei routinemässigen immunelektrophoretischen Reihenuntersuchungen einer größeren Herde von Versuchshühnern fiel ein Leghornhahn auf, der eine starke Verminderung von Immunglobulin G (IgG) bei gleichzeitig stark erhöhtem Immunglobulin M (IgM) aufwies (1). Diese Erscheinung der Serumeiweissveränderung ist vereinzelt beim Menschen bekannt. Die oben erwähnte Form wird von Rosen et al (2) auf Grund des erhöhten IgM-Wertes als Dysgammaglobulinämie bezeichnet.

Wir kennen beim Huhn zwei Immunglobuline, Immunglobulin G (IgG) und ein Immunglobulin M (IgM). Von verschiedenen Untersuchern wurde für das IgG des Huhnes eine Sedimentationskonstante von durchschnittlich 7,0 S ermittelt, und das Molekulargewicht mit durchschnittlich 175 000 berechnet (3, 4, 5, 6). Der Isoelektrische Punkt liegt bei 5,2 (5) und das Molekulargewicht liegt deutlich über dem für das Säuger-IgG angegebene Molekulargewicht (160 000). Für das makroglobuläre Immunglobulin des Huhnes, das IgM, wurde von Leslie und Clem (6) eine Sedimentationskonstante von 17 S und ein Molekulargewicht von 890 000 errechnet. Während sich also das IgG des Huhnes in einigen Eigenschaften vom IgG der Säuger unterscheidet, entspricht das IgM des Huhnes weitgehend dem Säuger-IgM (6).

Ein weiteres von Dreesman et al (3) vermutetes IgA konnte bislang weder isoliert noch charakterisiert werden.

Nach Kreuzungsversuchen (1) mit Leghornhühnern und einem Broilerhahn, der ein ähnliches immunelektrophoretisches Bild zeigte wie der oben erwähnte

dysgammaglobulinämische Hahn, und Rückkreuzungen mit den Merkmalsträgern konnte nach einiger Zeit eine Versuchstiergruppe mit vom Normalwert hochgradig abweichenden Serumimmunglobulingehalten zusammengestellt werden. Große Schwierigkeiten für die Nachzucht ergaben sich daraus, daß der Leghornhahn begattungsunfähig war und nach einem knappen Jahr impotent wurde. Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, daß ein Teil dieser aus der Nachzucht gewonnenen Küken - wohl auf Grund ihres geschwächten Abwehrmechanismus - die ersten Wochen nicht überlebten und so für unsere Versuche nicht oder nur teilweise benützt werden konnten.

Bei der fortlaufenden Bestimmung des Immunglobulinstatus der Versuchstiere fanden wir, daß sich bei manchen das bisher veränderte Immunglobulinbild im Verlauf der Entwicklung normalisierte. Auch solche Tiere waren für unsere Versuche nicht brauchbar.

Die Versuchstiere können auf Grund des getesteten Immunglobulinstatus folgendermaßen unterschieden werden:

1. Solche Tiere, bei denen sowohl IgG als auch IgM fehlen oder stark vermindert vorliegen, also das Bild einer Hypogammaglobulinämie zeigen, wenig resistent sind und nur kurze Zeit am Leben erhalten werden können.

2. Solche Tiere, bei denen IgG entweder ganz fehlt oder zumindest stark vermindert ist, die dabei aber IgM stark vermehrt aufweisen. Diese Erscheinung wird mit dem Begriff der Dysgammaglobulinämie beschrieben (2). Wegen der unterschiedlichen IgG-Gehalte im Serum dieser dysgammaglobulinämischen Hühner haben wir sie in zwei Gruppen eingeteilt:

Als Typ A werden alle Tiere bezeichnet, die bei stark vermehrtem IgM kein oder kaum meßbares IgG im Serum aufweisen.

Typ B nennt man solche Tiere, bei denen ein subnormaler IgG-Spiegel bei stark vermehrtem IgM nachgewiesen wurde.

Warner und Szenberg (7), Ortega und Der (8) und Cooper et al (9) berichten über experimentell bursektomierte Hühner. Dabei stellten sie fest, daß solche Küken stark verminderte IgG-Werte bei hohem IgM-Spiegel aufweisen können. Derartige Immunglobulinbilder werden auch von Merkenschlager et al (10) bei hormonell bursektomierten Küken beschrieben. Die Parallelität dieser Erscheinungen ließen eine Veränderung der Bursa Fabricii, einem nur beim Vogel vorhandenen, eigenständigen lymphoepithelialen Organ, das sich über dem Kloakendach befindet, bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern als Ursache dieses Antikörpermangelsyndroms möglich erscheinen. Die bisherigen Ergebnisse histologischer Untersuchungen unterstützen diese These (11).

Aus einer Aufstellung, die im Juni 1970 über die Nachkommenschaft dysgammaglobulinämischer Elterntiere im Hause durchgeführt wurde, geht hervor, daß von 100 Küken, die das Untersuchungsalter von 4 Wochen erreichten, 40 Küken normale und 60 Küken gestörte Immunglobulinbilder zeigten. Folgende Aufteilung wurde beobachtet:

34 Küken	IgG - (< 1 mg/ml[+])	IgM ++++ (> 300%[+])
13 Küken	IgG - (< 1 mg/ml)	IgM - (< 30%)
13 Küken	IgG + (1-8 mg/ml)	IgM ++++ (> 300%)

[+] siehe eindimensionale Immundiffusion (Material + Methode)

Da sowohl die durchschnittliche Befruchtungsrate der Eier als auch die Schlupf- und Überlebensrate der Küken aus dysgammaglobulinämischen Eltern extrem ungünstig ist, kann über die wahre Verteilung in der Nachkommenschaft mit dem bis jetzt vorliegenden Material noch keine Aussagen gemacht werden. Es ist möglich, daß sowohl bei den abgestorbenen Embryonen als auch bei den gestorbenen Küken bis zur vierten Lebenswoche (erster möglicher Untersuchungszeitpunkt zur Differenzierung) die Zahl der immunologisch insuffizienten Tiere überwiegt.

Aus den eingangs gemachten Überlegungen ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. In wieweit sind dysgammaglobulinämische Hühner zur Antikörperbildung fähig?

2. Unterscheiden sich Typ A und Typ B der dysgammaglobulinämischen Hühner in der Antikörperbildung?

3. Mit welchem Immunglobulin (IgG oder IgM) werden von dysgammaglobulinämischen Hühnern Antikörper gebildet?

Als geeignete Methoden haben sich folgende Versuchsanordnungen erwiesen:

1. Immunelektrophorese und einfache radiale Immundiffusion zur Differenzierung von Typ A + B.

2. Zweidimensionale Immundiffusion zur Beurteilung der grundlegenden Potenz zur Bildung spezifischer Präzipitine.

3. Mit Hilfe der Bestimmung des Antigenbindungsvermögens werden überprüft
   a) Antigenbindende Antikörper, auch dann, wenn keine präzipitierende Antikörper vorliegen

b) quantitative Antigenbindungsfähigkeit.

4. Radioimmunelektrophorese zur Differenzierung der die spezifische Aktivität enthaltenden Immunglobuline.

II. Material und Methode

1. Tiermaterial, Haltung und Fütterung

Für unsere Versuche verwendeten wir männliche und weibliche Hühner ab der 14.Lebenswoche aus der oben erwähnten Nachzucht, dazu gleichaltrige Leghorn- und Broilerhühner beiderlei Geschlechts, die einen normalen Immunglobulintiter zeigten, als Kontrolltiere. Diese Tiere wurden zu kleinen Gruppen in Drahtkäfigen gehalten. Die weiblichen Tiere wurden nach der Begattung zur Eiablage in Ablegebatterien verbracht. Die Käfige standen in halbisolierten Stallungen. Gefüttert wurde mit handelsüblichem Kükenalleinfutter[+], Junghennenalleinfutter[++] und Legemehl[+++]. Dem Trinkwasser wurde zu bestimmten Zeitpunkten[++++] Tylosintartrat[+++++] zugesetzt, um insbesondere mögliche Mycoplasmainfektionen zu verhindern. Futter und Trinkwasser konnten ad libitum aufgenommen werden.

[+] Zusammensetzung:
31,000% Mais
30,000% Weizen
17,000% Sojaschrot, extr.
5,000% Fischmehl
4,000% Luzernegrasgrünmehl
3,675% Weizenbollmehl
3,000% Maisklebefutter
2,000% Malzkeime, getr. u. zerkl.
2,000% Mineralstoffmischung für Geflügel
1,000% Futterfett
1,000% Melasse
0,300% Vitamin-Vormischung für Geflügel
0,025% Antibiotica-Vormischung Chlortetracylin Reg.-Nr. TM 99/69 (10 mg/kg Mischfutter)

[++] Zusammensetzung:
30,00% Mais
23,00% Weizen
8,30% Weizenbollmehl
8,00% Tapiokamehl
7,00% Sojaschrot, extra
5,00% Weizenkleie
4,00% Maiskleberfutter
4,00% Luzernegrasgrünmehl
3,00% Fischmehl
2,50% Mineralstoffmischung für Geflügel
2,00% Malzkeime, getr. u. zerkl.
1,00% Tiermehl
1,00% Futterfett
1,00% Melasse
0,20% Vitamin-Vormischung für Geflügel

[+++] Zusammensetzung
25,00% Mais
21,00% Sojaschrot extr.
20,00% Weizen
6,00% Fischmehl
6,00% Tapiokamehl
4,05% Weizenbollmehl
4,00% Luzernegrasgrünmehl
4,00% Mineralstoffmischung für Geflügel
3,00% kohlens. Futterkalk
2,00% Malzkeime, getr. u. zerkl.
2,00 % Tiermehl
1,00% Futterfett
1,00% Melasse
0,50 % Vitamin-Vormischung für Geflügel
0,45 % Paprika, gemahlen

Bei allen Mischungen: Methionin und Cystingehalt nach DLG Standard

[++++] Zur Prophylaxe werden 0,5 g Elanco-T solubile pro Liter Trinkwasser während der ersten fünf Lebenstage gegeben, die gleiche Menge 48 Stunden lang im Alter von vier Wochen.
Wiederholte Gaben über zwei Tage in der gleichen Dosierung sind in der 9., 16., 20. und 24. Lebenswoche der Tiere angebracht.

[+++++] Elanco-T, (Tylosintartrat ad. us. vet.) für Hühner und Truthühner der ELY LILLY GmbH, Gießen.

2. Immunisierung

Im Alter von ca. 14 Wochen wurden alle im Versuch verwendeten Tiere zum erstenmal mit 10%igem Humanserumalbumin (HSA)+ immunisiert. Die Dosis von 40 mg HSA pro kg Körpergewicht wurde nach den Angaben von Blazkovec und Woolfe (12) in die Flügelvene injiziert. Die beste Boosterun wird bei Hühnern 36 Wochen nach der ersten Immunisierung erzielt (12). Deshalb wurde bei den Versuchstieren in der ca. 50. Lebenswoche nochmals 40 mg HSA pro kg Körpergewicht in die Flügelvene injiziert. Eine Drittimunisierung wurde durch eine weitere Injektion von 40 mg HSA pro kg Körpergewicht i.v. in der 58. Lebenswoche durchgeführt (Tab. 1).

Tabelle 1

Tier		Alter: 14 Wo		Alter: 50 Wo		Alter 58 Wo
		I.Immunisierung		II.Immunisierung		III.Immunisierung
	N		N		N	
Ko	9	40 mg/kg i.v.	6	40 mg/kg i.v.	6	40 mg/kg i.v.
Typ A	12	40 mg/kg i.v.	11	40 mg/kg i.v.	6	40 mg/kg i.v.
Typ B	8	40 mg/kg i.v.	6	40 mg/kg i.v.	5	40 mg/kg i.v.

Tabelle 1 Immunisierungsschema normaler und dysgammaglobulinämischer Hühner mit HSA

Typ A + B siehe Einleitung
HSA = Humanserumalbumin
Ko = Kontrolltiere
Wo = Wochen
N = Tierzahl

+ Welches uns freundlicherweise vom Radiochemical Center Pharmaceutical Department, Amersham, Großbritanien zur Verfügung gestellt wurde.

3. Serumgewinnung

Um den exakten Zeitpunkt der maximalen Antikörpermengen nach einer Immunisierung zu erfassen, wurde in einem Vorversuch vom 4. - 12. Tag nach der Immunisierung das Serum von den Versuchstieren getestet. Dabei wurden vom 6. - 8. Tag nach der Immunisierung die höchsten Antikörpertiter gemessen. Deshalb wurde für unsere Versuche am 6. und 8. Tag nach jeder Immunisierung mit einer innen polierten Kanüle[+] aus der Flügelvene Blut entnommen, welches man in einem Reagenzglas auffing. Der sich absetzende Blutkuchen wurde mit einem Glasstab von der Reagenzglaswand abgelöst, und das Blut ca. 1 Stunde bei 37° C und weitere drei bis vier Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Danach dekantierte man das Serum und zentrifugierte den Rückstand bei 3 000 UpM zehn Minuten lang. Das Serum, das nicht sofort untersucht wurde, füllte man in Plastikschläuche und fror sie zur späteren Verwendung bei - 20° C ein.

4. Antiserumgewinnung

Ein polyvalentes Antiserum gewannen wir für unsere Versuche von Kaninchen, denen wöchentlich je ein ml eines verdünnten Hühnerserums (1% Protein) injiziert wurde. Während die erste Injektion zusammen mit einem ml Freund's Adjuvans subcutan in die Zwischenzehenfalten und die Regionen der axillaren und inguinalen Lymphknoten verabreicht wurde, erfolgten sechs bis zehn weitere Injektionen ohne Freund's Adjuvans intravenös. Die Kaninchen bildeten gegen die in dem injizierten Hühnerserum enthaltenen Serumproteine Antikörper. Eine zweite Immunisierungstechnik, bei der die gleiche Antigenmenge mit Freund's Adjuvans auf 20 Stellen verteilt intracutan appliziert und bei Nichtreaktion in die Oberarm- und Oberschenkelmuskulatur ohne Freund's Adjuvans nachinjiziert wurde, fand auch Verwendung.

[+]Firma Hauptner, Innendurchmesser o,8 mm

Bringt man in der Immunelektrophorese Hühnerserum mit diesem antikörperhaltigen Kaninchenserum zusammen, so werden sämtliche Serumproteine in ihren charakteristischen Präzipitationslinien dargestellt.

Da bei unseren Versuchen vor allem interessierte, in wieweit bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern IgG und IgM vorhanden waren, und mit welchem der Immunglobuline die Versuchstiere ihre Antikörper bildeten, benötigten wir monovalente Antiseren, die entweder nur Antikörper gegen IgG oder IgM enthielten.

Zur Herstellung von Antiserum gegen IgG wurde das aus den Kaninchen gewonnene polyvalente Antiserum mit Serum von keimfreien und dysgammaglobulinämischen Hühnern abgesättigt. Die keimfreien Tiere und die dysgammaglobulinämischen haben nur einen geringen IgG-Spiegel, jedoch ist bei letzteren der IgM-Spiegel sehr hoch. Bringt man diese drei Seren in gegebenen Mengenverhältnissen - die sich auf Grund von Vorversuchen als optimal erweisen - zusammen, so werden ausser Anti-IgG alle von Kaninchen gebildeten Antikörper im Serum gebunden.

Ein Antiserum gegen IgM wurde folgendermaßen gewonnen: Zu dem oben erwähnten polyvalenten Antiserum wird im Verhältnis 1 : 2 Serum von Eintagsküken gegeben. Diese haben über den Dottersack eine große Menge an IgG mitbekommen, jedoch kein IgM, das sie am ersten Lebenstag auch noch nicht produzieren können. Bringt man diese beiden Seren zusammen, so werden im polyvalenten Antiserum alle Antikörper außer denen gegen IgM gebunden. Da bei den Eintagsküken offensichtlich ein α-Protein relativ schwach konzentriert im Serum vorliegt, muß das so gewonnene Antiserum mit Serum keimfreier Hühner weiter abgesättigt werden, worauf ein monovalentes Antiserum gegen IgM entsteht.

5. Nachweis-Methoden

a) Immunelektrophorese

Material:

1. Geschliffene Objektträger von LKB[+]
2. Stanzen und Rahmen für je sechs Objektträger der LKB-Immunelektrophoreseausrüstung
3. Diäthylbarbituratsäure-Acetat-Pufferlösung pH 8,2 μ = 0,1 nach Michaelis

   Stammlösung: 294,3 g Natrium-diäthylbarbiturat
   194,3 g Natriumacetat-trihydrat
   ad 10 l Wasser

   Zu acht Teilen der Stammlösung gibt man 9,6 Teile Wasser und stellt mit 0,1 n HCl den pH-Wert 8,2 ein. Diese Lösung hat eine Jonenstärke von μ = 0,15. Für die Elektrophorese wird sie noch einmal verdünnt, um eine Jonenstärke von μ = 0,1 zu erhalten: zu zwei Teilen Puffer gibt man ein Teil aqua dest.

4. 1 g Agarose[++] auf 100 ml obigen Puffers

Methode:

Erstmals beschrieben Grabar und Williams (13) die Immunelektrophorese, welche wir in der Modifikation der Mikromethode nach Scheidegger (14) benützen. Hierbei werden die Serumproteinmoleküle durch zwei aufeinanderfolgende Vorgänge aufgetrennt und identifiziert: Die Elektrophorese und eine nachfolgende Immundiffusion. Bei der Elektrophorese macht man sich zu Nutzen, daß die Proteinmoleküle auf Grund ihres unterschiedlichen Ladungs-Massequotienten in einem elektrostatischen Feld verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten auf-

[+] LKB-Produkter AB Stockholm

[++] Agarose reinst SO_4 H-Gruppen < 0,03 m Val/g
CO_3 H-Gruppen < 0,2 m Val/g
Serva Entwicklungslabor, Heidelberg

weisen. Da sie sich als Ampholyte in Abhängigkeit vom Milieu, in dem sie sich befinden, sowohl als Kationen wie auch als Anionen verhalten können, spielt der pH-Wert des Mediums neben der angelegten Spannung sowie der Molekülgröße und -ladung für die Wanderungsgeschwindigkeit und -richtung eine entscheidende Rolle. - Im allgemeinen wird die Elektrophorese auf einem Trägermaterial durchgeführt; dafür eignen sich besonders Papier und Stärke - oder Agargel. Das zu untersuchende Serum wird an einer vorher markierten Stelle auf das Trägermaterial gegeben und in einer Pufferlösung mit bekanntem pH eine bestimmte Zeit unter eine bekannte Spannung gesetzt. Nach dieser Zeit können die einzelnen Proteingruppen an Hand der verschiedenen Wegstrecken, die sie zurückgelegt haben, unterschieden werden.

Nach der Elektrophorese im Agargel läßt man in einem Graben, der parallel zur Achse der Wanderungsrichtung der Serumproteine ausgehoben wurde, Antiserum diffundieren. Dieses bildet mit den einzelnen Serumproteinen charakteristische bogenförmige Präzipitate.

Für unsere Versuche wurden als Wanderungs- und Diffusionsmedium 1 %ige Agarose benützt, welche in einem Veronal-Natrium-Puffer gelöst wurde, der eine Jonenstärke von μ = 0,1 und einen pH von 8,2 besaß. Die Laufzeit betrug 80 Minuten bei ca. 7 Volt pro cm.

Nach der Diffusion werden die Rahmen für 48 Stunden in physiologische Kochsalzlösung gelegt, um alles ungebundene Protein zu entfernen. Ein anschließendes Wässern in destilliertem Wasser über vier Stunden bewirkt ein Auswaschen der Puffersalze. Danach trocknet man die Plättchen unter gut angefeuchteten Filterpapierstreifen, und färbt sie zuletzt mit Azocarmin und Amidoschwarz folgender Zusammensetzung und Anordnung:

1. Azocarmin 1 g
   + Essigsäure 1 M 450 ml
   + Natriumacetat 0,1 M 450 ml
   5 Minuten färben

2. Entfärben mit 2 %iger Essigsäure
   3 Minuten

3. Amidoschwarz 1 g
   + Essigsäure 1 M 450 ml
   + Natriumacetat 0,1 M 450 ml
   5 Minuten färben

4. Entfärben mit2%iger Essigsäure
   2-3-5 Minuten

Ein Vorfärben mit Azocarmin hat sich für die anschließende Amidoschwarzfärbung als besonders günstig erwiesen.

b) Einfache radiale Immundiffusion nach Mancini

Material:

1. Geschliffene Objektträger LKB+

2. Objektträgerrahmen und Stanzen mit zehn-Loch-Muster LKB

3. Phosphatgepufferte NaCl-Lösung++
   oder als Puffer Diäthylbarbituratsäureacetat-Puffer pH 8,2 nach Michaelis (s.Immunelektrophorese)

4. 3 g Agarose+++ auf 100 ml obigen Puffers

+ s.S. 12

++ Phosphatgepufferte NaCl-Lösung: 0,58 g NaCl
0,52 g $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
ad 100 ml aqua dest.
mit n/10 NaOH auf pH 8,0 einstellen

+++ s.S. 12

Zur quantitativen Bestimmung der totalen IgG- und IgM-Werte der einzelnen Serumproben wurde die Immundiffusionsmethode nach Mancini et al (15) modifiziert nach Gruber (16) angewendet. Mit dreiprozentiger Agarose wird das in der gewünschten Verdünnung hergestellte Antiserum bei 56° C 1 : 1 vermischt und auf Glasplatten aufgetragen. Nach dem Erkalten des Agarose-Antiserum-Gemisches werden pro Objektträger zehn Löcher ausgestanzt, die anschließend mit Hilfe einer Mikropipette mit den zu untersuchenden Serumprobenverdünnungen und einer Standardlösung bekannten Proteingehaltes (IgG) beziehungsweise einem Vergleichsvollserum (IgM) gefüllt werden. Von jeder Probe werden mindestens vier im Meßbereich liegende Verdünnungsstufen hergestellt und jeweils dreimal aufgetragen.

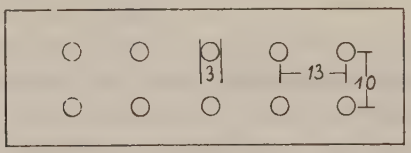

Fig. 1 Lochmuster der einfachen radialen Immundiffusion

Zur Diffusion werden die Rahmen in streng horizontaler Lage in eine feuchte Kammer gebracht. Nach der Diffusion wird das nicht präzipitierte Eiweiß mit physiologischer Kochsalzlösung über zwei bis drei Tage hin ausgewaschen. Anschließend folgen ein ca. vierstündiges Bad der Objektträger in aqua dest., um die Puffersalze auszuwaschen, und Trocknen unter zuvor gut angefeuchtetem Filterpapier. Gefärbt wird mit Amidoschwarz (siehe Immunelektrophorese) 10 - 15 Minuten. Zur Auswertung der Ergebnisse werden die Quer- und Diagonaldurchmesser einer jeden Präzipitationsfläche mit einem Mikrofilmlesegerät mit bekannter Vergrößerung ermittelt. Aus dem arithmetischen Mittel der einzelnen Werte aller Verdünnungsstufen wird eine Bezugskurve angefertigt. Trägt man die quadrierten Durchmesser der Standardwerte in

einer Achse auf, so erhält man eine Gerade als Bezugskurve, mit der sich die Immunglobulinkonzentration in den zu untersuchenden Seren bestimmen läßt.

Entsprechend den verwendeten Standardlösungen werden die umgerechneten IgG-Gehalte in mg pro 100 ml und die IgM-Gehalte in % ausgedrückt. 100 % sind gleich dem IgM-Gehalt des verwendeten Standardserums.

c) Zweidimensionale Immundiffusion nach Ouchterlony

Material:

1. Geschliffene Objektträger LKB+

2. Stanzen und Rahmen für je sechs Objektträger von LKB+

3. Phosphatgepufferte NaCl-Lösung+++:
   (Wie bei der einfachen radialen Immundiffusion)

4. 2 g Agarose+ auf 100 ml obigen Puffers

5. 0,1 g Thiocid++ - Zusatz (1:1 000)

Methode:

Bei der zweidimensionalen Immundiffusion nach Ouchterlony (17) handelt es sich um eine semiquantitative Messung der spezifisch gebildeten Antikörper nach dem Prinzip der Endpunktbestimmung.

Die vorbehandelten Objektträger werden mit Agar beschichtet. Nach dem Erkalten (mindestens eine Stunde bei Kühlschranktemperatur) werden mit der LKB-Stanze in rosettenförmigem Muster Löcher in den Agar gestanzt.

+ s.S. 12

++ Thiocid: P-(Aethyl-mercuri-mercapto)-benzolsulfonsaures Natrium
Firma ASID-Institut GmbH, München-Lohof

+++ wir verwendeten sowohl 0,9 %ige als auch 8,0 %ige NaCl-Lösung

Pro Objektträger haben zwei Rosetten Platz. In die Mitte der Rosette kommt das zu untersuchende Serum eines mit HSA immunisierten Tieres. In die außen liegenden Löcher werden geometrische Verdünnungsreihen einer 1 %igen HSA-Lösung ($\frac{1}{1}$ - $\frac{1}{2048}$) gefüllt. Nach 24 Stunden Diffusion liest man diejenigen Werte ab, bei denen eine eben noch sichtbare Präzipitationslinie mit dem Antiserum zu erkennen ist.

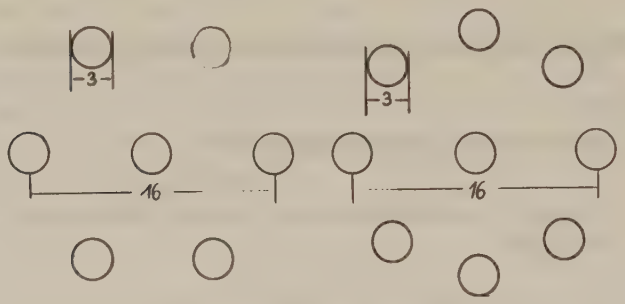

Fig. 2
Rosettenmuster zur zweidimensionalen Immundiffusion. Je zwei dieser Rosetten passen auf einen Objektträger.

Die Plättchen werden anschließend wiederum in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, kurze Zeit in aqua dest. gelegt und mit Amidoschwarz (siehe Immunelektrophorese) gefärbt.

d) Farr-Technik (Antigen-Binding-Capacity = ABC-Test)

Material:

1. Jod ^{131}-Humanserumalbumin^{+} (weniger als ein Molekül Jod pro Molekül Albumin) mit einer spezifischen Aktivität von 2-3 μCi/mcg N^{++}

$^{+}$bezogen vom Radiochemical Centre Amersham, England

$^{++}$Eine 0,005 %ige HSA-Lösung (= 8mcg N/ml) wurde so markiert, daß 1 mcg Albuminstickstoff (im folgenden als Antigen-N bezeichnet) eine spezifische Aktivität von 2-3 μCi besitzt.

2. Borat-Puffer pH 8,3 - 8,5 Jonenstärke 0,1
   6,184 g Borsäure
   9,536 g di-Natriumtetraborat (kristallwasserfrei)
   4,384 g NaCl

3. Normalserum (1-10)
   Ein Teil Normalserum und neun Teile Borat-Puffer

4. Normalserum (1-100)
   Ein Teil Normalserum und neunundneunzig Teile Borat-Puffer

5. Gesättigte Ammoniumsulfatlösung
   Gesättigt bei 4^{o} C in aqua dest.

6. 50 % gesättigte Ammoniumsulfatlösung

7. 20 %ige Trichloressigsäure

8. Reagenzgläser[+]

9. Strahlungsmessgerät[++]

10. Szintillationszähler[+++]

11. γ-Messkopf[++++]

12. Antigenverdünnungen:
    Herstellung mit Normalserum 1:100 von 0,02-2,0 N/ml

13. Antiserumverdünnungen:
    Erste Verdünnung: ein Teil Antiserum und neun Teile Borat-Puffer
    Folgende Verdünnung: Herstellung mit Normalserum 1:10
    Sechs Verdünnungsstufen 1-5

[+] Wir verwendeten Einweg-Reagenz- und Zentrifugenröhrchen ohne Wulst Nr. 95/16 Polystyrol der Firma Walter Sarstedt, Rommelsdorf

[++] Strahlungsmessgerät FH 49)
[+++] Szintillationszähler FH 421) alle von der Firma Frieseke und Höpfner GmbH, Erlangen Bruck
[++++] γ-Messkopf FH 421/Z6 mit NaJ (Tl) - Bohrlochkristall))

Methode:

Der ABC-Test nach Farr (18) eignet sich zum quantitativen Nachweis des Antigenbindungsvermögens nach der Immunisierung mit HSA, wobei eine direkte Beziehung zwischen gebundenem Antigen und den registrierten Impulsen pro Minute des radioaktiv markierten Antigens in den einzelnen Versuchsröhrchen besteht.

a) Testseren:

Alle Verdünnungsstufen werden doppelt angesetzt; zu je 0,5 ml einer jeden Verdünnungsstufe in einem Reagenzglas werden 0,5 ml der Antigenverdünnung gegeben, gut durchgeschüttelt und 12 Stunden bei 4° C aufbewahrt. Danach pipettiert man 1 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung in jedes Versuchsröhrchen und schüttelt sofort solange gut durch, bis sich Schlieren zeigen, und stellt die Röhrchen für 30 Minuten in den Kühlschrank. Nun wird 30 Minuten lang bei 4° C und 2 000 UpM zentrifugiert. Im Anschluß daran wird der Überstand abgeschüttet und in jedes Versuchsröhrchen 3 ml 50 % gesättigte Ammoniumsulfatlösung gegeben. Ein nochmaliges Zentrifugieren bei den oben genannten Bedingungen und Abschütten des Überstandes bilden den Abschluß.

b) Kontrollseren

Die drei Kontrollseren werden jeweils doppelt angesetzt. Kontrolle 1 enthält 0,5 ml des Normalserums 1-10. Kontrolle 2 enthält 0,5 ml des Normalserums 1-100. In alle Kontrollröhrchen (1-3) pipettiert man 0,5 ml der Antigenverdünnung, schüttelt gut durch und stellt sie für 12 Stunden in den Kühlschrank. Zu Kontrolle 1 wird danach 1 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung gegeben, und bis zur Schlieren-

bildung gut durchgeschüttelt. Dann zentrifugiert man 30 Minuten lang bei 4° C und 2 000 UpM. Die weitere Behandlung von Kontrolle 1 erfolgt gemäß den Testseren. Zu Kontrolle 2 gibt man 1 ml 20 %iger Trichloressigsäure. 30 Minuten lang wird bei 4° C und 2 000 UpM zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Kontrolle 3 enthält nur 0,5 ml der Antigenverdünnung.

Messungen:

Die Messungen werden mit dem Gammastrahlendetektor vorgenommen. Jede Probe wird viermal eine Minute lang gemessen und um den Nullwert korrigiert.

Berechnung des gebundenen Antigens:
Dividiert man die Ausschläge in Kontrolle 2 durch die Ausschläge in Kontrolle 3 und multipliziert man den Quotienten mit einhundert, so erhält man den Prozentsatz des proteingebundenen Antigens. Dieses soll nur verwendet werden, wenn der Prozentsatz über 97 % liegt.

Zur Berechnung des gebundenen Antigens müssen folgende Faktoren ermittelt werden:

Ko = Kontrolle

$$CF = \text{Korrekturfaktor} = \frac{\text{Ausschläge in Ko 1}}{\text{Ausschläge in Ko 3} - \text{Ausschläge in Ko 1}}$$

Std = Standard = Ausschläge in Ko 3 korrigiert um den Nullwert

Ppt = Präzipitat = Ausschläge in den Versuchsröhrchen korrigiert um den Nullwert

Ppt_{NS} = Unspezifische Ausschläge im Präzipitat
= (Std.-Ppt) (CF)

Ppt_{Corr} = korrigiertes Präzipitat
= $Ppt - Ppt_{NS}$

$$\% \text{ präzipitierten Antigens} = \frac{Ppt_{Corr}}{Std} \cdot 100$$

Diese Berechnungen müssen für jedes Versuchsröhrchen gemacht werden. Nach diesen Berechnungen trägt man auf einem halblogarithmischen Papier die Werte folgendermaßen auf: Auf der y-Achse stehen die Prozente des gefällten Antigens, die reziproken Werte der Verdünnungen erscheinen auf der x-Achse (logarithmische Achse). Nun sucht man auf den sich ergebenden Kurven die Verdünnungsstufe auf, bei der 33 % Antigen des jeweiligen Versuchserums gebunden sind, und berechnet aus dem gefundenen Wert die genaue Menge an gebundenem Protein durch folgende Formel:

Verdünnungsgrad bei 33 %$^{+}$ X Ag^{++} X 0,33 X 2 = pro ml gebundenem Antigen

d) Radioimmunelektrophorese

Material:

Wie bei der Immunelektrophorese (siehe dort) dazu:

1. J^{131} - HSA-Lösung^{+++}
2. Röntgenfilm^{++++}

Methode:

Um nachzuweisen von welchen Immunglobulinen die spezifischen Antikörper gebildet werden, wendeten wir die Radioimmunelektrophorese an. Diese gibt neben der Aufschlüsselung des reagierenden Immunglobulintyps Anhaltspunkte über die Lokalisation der Antikörper in den bogenförmigen Präzipitaten der Immunelektrophorese. Dabei können radioaktive Spurenbanden nachgewiesen werden, die den exakteren, jedoch unempfindlicheren Zählmethoden verborgen bleiben (19).

+Verdünnungsgrad bei 33 % = reziproke Verdünnung bei 33 % gebundenem Antigen

++Ag = mcg N/ml des Antigens, das zu den Versuchsröhrchen gegeben wurde

+++Wir verwendeten 0,005 %ige J^{131} - HSA-Lösung mit einer Aktivität von 1,0 mCi/mg Albumin, die durch die Firma Buchler, Braunschweig im Radiochemical Centre Amersham, England hergestellt wurde.

++++ Wir führten unsere Untersuchungen mit Agfa-Gevaert Ultra Rapid L 4 x 5 cm durch.

Im Anschluß an die Elektrophorese (siehe oben) werden in den ausgestanzten Graben mono- beziehungsweise polyvalentes Antiserum und J^{131}-HSA gegeben. Nach der Diffusion, dem Waschen und Trocknen wird auf jeden Objektträger eine photographische Platte gelegt. Wir klebten dieses photographische Material mit Tesaband fest, damit es unter keinen Umständen verschoben werden konnte und beschwerten die Filme gleichzeitig mit Bleigewichten, um den Abstand zwischen Objektträger und Film auf ein Minimum zu reduzieren.

Die Schwärzung der photographischen Platte durch radioaktive Strahlung (Autoradiographie) ist von einigen Hauptkriterien abhängig:

1. Menge und Art der verwendeten Radioaktivität
2. Expositionszeit
3. Filmmaterial

Die Menge der für genaue Messungen benötigten Radioaktivität läßt sich nach Schütte (20) aus folgenden Werten errechnen:

a) Impulse / min / mMol bei einem Molgewicht von x

b) Kernumwandlungen / min / mMol = x μCi / mMol

Dabei gilt als Richtwert für eine gute Schwärzung, daß etwa 10^5 - 10^7 β - Teilchen pro cm^2 auf den Film auftreffen sollen, was bei einer Expositionszeit von 200 Tagen 3 - 30 Impulse pro Minute und cm^2 entspricht (1 Ci $\triangleq$ 3,7 X 10^{10} Imp/min).

Nicht nur die Menge der verwendeten Radioaktivität ist für die optimale Schwärzung der photographischen Platte von Wichtigkeit, sondern auch die Strahlenqualität. Die Spur der α-Teilchen zeigt sich in einem dicken, schwarzen Strich; β-Teilchen erzeugen eine dünne Linie. γ-Strahlen verschleiern die Platte

gleichmäßig, was auf der Durchdringungsfähigkeit der kurzwelligen, elektromagnetischen Strahlung beruht; letztere sind demnach zur Erzeugung autoradiographischer Bilder ungeeignet.

Aus dem oben Gesagten zeigt sich für die Expositionszeit eine Abhängigkeit von dem verwendeten radioaktiven Isotop. Sehr geringe Radioaktivitäten langlebiger Radioisotope sind mit entsprechend langer Expositionszeit nachweisbar, auch solche, die bei gewöhnlichen Zählrohren innerhalb der Standardabweichung des Nulleffektes liegen. - Als Faustregel für die Expositionszeit gilt, daß man nicht länger als zwei Halbwertszeiten belichten soll[+], da zu diesem Zeitpunkt 75 % der Radioaktivität abgeklungen sind, und die Untergrundschwärzung, die durch Höhen- und Umgebungsstrahlen entsteht, einen zu großen Umfang annimmt.

Nach Hiller-Jakob (21) läßt sich die exakte Expositionszeit folgendermaßen ermitteln:

"Nimmt man an, daß eine bestimmte Schwärzung N durch eine Menge L auftreffender Teilchen hervorgerufen wird, so ist L offenbar abhängig von der Zerfallsgröße des Radioelements und seiner im Präparat vorhandenen Menge. Sei die im Präpitat ursprünglich vorhandene Menge mit A_o, die zu einer späteren Zeit t noch vorhandene Menge mit A_t bezeichnet, so ergibt sich für L :

$$L = A_o - A_t \qquad (1)$$

Nun ist aber

$$A_t = A_o \cdot e^{-\lambda t} \qquad (2)$$

und $$L = A_o \left(1 - e^{-\lambda t} \right) \qquad (3)$$

[+]Die Halbwertszeit für J^{131} beträgt 8 Tage

Für t der Expositionszeit erhält man aus (1), (2), (3)

$$t = \frac{T}{0{,}693} \quad 10 \quad \frac{A_o}{A_o - L}$$

Wobei T die Halbwertszeit des Elements darstellt."

Für die Autoradiographie eignen sich mehrere Arten photographischen Materials:

1. Röntgenfilm
2. Strippingfilm
3. flüssige Emulsionen

Alle drei Arten sind gleich geeignet, ein optimales Bild zu erzielen. Ihre unterschiedlichen Eigenschaften liegen nur auf arbeitstechnischem Gebiet.

Um ein gutes Bild zu erhalten, ist es vom photographischen Material aus am wichtigsten, daß dieses frisch und unverdorben ist. Wie aus der Radiologie bekannt ist, bedingt schlechtes Filmmaterial erhebliche Fehler in der Auswertung der Bilder. Am Ende der berechneten Expositionszeit (wir haben 8 - 14 Tage belichtet), werden die Filme abgenommen und entwickelt. Durch das Auflegen der entsprechenden Filme auf die Objektträger der Radioimmunelektrophorese können die identischen Linien miteinander verglichen werden.

Broda (22) berichtet von einem Vorschlag, zwischen Probe und photographisches Material einen dünnen fluoreszierenden Schirm zu fügen. Dadurch wird eine größere Anzahl an Lichtquanten emittiert, und man erzielt eine verstärkte Schwärzung.

III. Ergebnisse

1. Aufschlüsselung des Tiermaterials nach dem Immunglobulinstatus

Mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion nach Mancini wurde die Höhe der Immunglobulinspiegel, unterschieden nach IgG und IgM, der einzelnen Versuchstiere ermittelt, und diese daraufhin den verschiedenen Typen zugeordnet. Die Normaltiere, die wir als Kontrollen verwendeten, zeigten einen IgG-Spiegel, der sich zwischen 905 und 1460 mg/100 ml Serum bewegte und einen solchen von IgM zwischen 70 und 240 %. Bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern sind die IgG-Werte vermindert und die IgM-Werte erhöht. Nach den vorhandenen Mengen an IgG wurden die Tiere in die Typen A und B eingeteilt. Bei Typ A findet man IgG-Werte zwischen < 1 und 100 mg/100 ml. Die IgM-Werte liegen zwischen 800 und 1630 %. Die Tiere des Typ B weisen IgG-Serumkonzentrationen > 100 und 800 mg/100 ml auf und IgM-Konzentration von 720 - 1310 %. Siehe Tabelle 2

Die IgG- und IgM-Werte der einzelnen Versuchstiere wurden laufenden Untersuchungen entnommen.

Tabelle 2

Tier	mg IgG / 100 ml	IgM %
Kontrolle	905 - 1460	70 - 260
Typ A	< 1 - 100	800 - 1630
Typ B	> 100 - 800	720 - 1310

Tabelle 2 Immunglobulinstatus normaler und dysgammaglobulinämischer Hühner

Die Tiere des Typ A haben stark verminderte IgG-Werte und stark erhöhte IgM-Werte.

Die Tiere des Typ B zeigen subnormale IgG-Werte und stark erhöhte IgM-Werte.

2. Präzipitinbildung

In der zweidimmensionalen Immundiffusion nach Ouchterlony wurden die auf HSA-Immunisierung gebildeten Antikörper semiquantitativ nach dem Prinzip der Endpunktbestimmung erfaßt. Dabei zeigten sich folgende Reaktionstypen, die in Tabelle 3 zusammengestellt sind.

a) Alle Kontrolltiere und die Tiere des Typs B_1 bildeten nach der I. - III. Immunisierung mit Humanserum albumin hohe Antikörpertiter (bis zu einer Verdünnungsstufe von $\frac{1}{1024}$ - $\frac{1}{2048}$ einer 1%igen HSA-Verdünnung).

b) Die Tiere des Typs A_1 zeigten bei dreimaliger Immunisierung mit HSA totalen Antikörpermangel.

c) Die Tiere des Typs A_2 bildeten gut meßbare Antikörper nach der I. Immunisierung mit HSA jedoch keine nach der II. und III. Immunisierung.

d) Die Tiere des Typs A_3 und B_2 zeigten langsam ansteigende Antikörpertiter von der I. bis zur III. Immunisierung. Wobei Typ B_2 nach der II. und III. Immunisierung etwas höhere Titer aufwies als Typ A_3.

Tabelle 3

Tiere	N	I.Immunisierung	N	II.Immunisierung	N	III.Immunisierung
Ko	9	(+++) $\frac{1}{1\,024} - \frac{1}{2\,048}$	6	(+++) $\frac{1}{1\,024} - \frac{1}{2\,048}$	6	(+++) $\frac{1}{512} - \frac{1}{1\,024}$
A_1	5	(-) -	5	(-) -	3	(-) -
A_2	3	(+++) $\frac{1}{1\,024} - \frac{1}{2\,048}$	2	(-) -	1	(-) -
A_3	4	(-+) $\frac{1}{1}$	4	(+-) $\frac{1}{2}$	2	(++) $\frac{1}{128} - \frac{1}{256}$
B_1	3	(+++) $\frac{1}{1\,024} - \frac{1}{2\,048}$	2	(+++) $\frac{1}{1\,024} - \frac{1}{1\,048}$	2	(+++) $\frac{1}{512} - \frac{1}{1\,024}$
B_2	5	(-+) $\frac{1}{1}$	4	(+) $\frac{1}{2} - \frac{1}{4}$	3	(++) $\frac{1}{256} - \frac{1}{512}$

Tabelle 3 Reaktionsformen bezüglich der Präzipitinbildungsfähigkeit normaler und dysgammaglobulinämischer Hühner nach dreimaliger Immunisierung mit Humanserumalbumin

Ko = Kontrolltiere
N = Tierzahl

-+ ..... +++ = steigende Beurteilung der Antikörpertiter

$\frac{1}{r}$ ..... $\frac{1}{2048}$ = letzte sichtbare Präzipitation des Antikörpers mit dem Antigen

3. Antigenbindungsfähigkeit

Im Antigen-Binding-Capacity-Test (ABC-Test) wurde die Menge des gebundenen Antigens im Serum mit HSA immunisierter Hühner quantitativ gemessen (siehe Tabelle 4) und gleichzeitig überprüft, ob trotz Mangel an präzipitierenden Antikörpern antigenbindende vorliegen.

Da der Antigen-Binding-Capacity-Test der RJE gegenüber relativ unempfindlicher ist, können damit nur Werte ab einer gewissen Konzentration genau berechnet werden. Geringe Mengen an gebundenem Antigen werden zwar im Gammastrahlendetektor gezählt, können aber nur interpoliert werden. Mit den vorgegebenen Verdünnungsstufen können bis zu 2,3 mcg Antigen-N bestimmt werden, wenn bei 33 % des gefällten Antigens abgelesen wird (siehe ABC-Test). Niedrigere Werte müssen interpoliert werden.

Tabelle 4

Tier	I. Immunisierung mcg N/ml	II. Immunisierung mcg N/ml	III. Immunisierung mcg N/ml
Kontrolle	46,0	267	214
Typ A_1	-	-	-
Typ A_2	24,0	-	-
Typ A_3	-	$\leq$ 0,4^{+}	7,0
Typ B_1	32,0	204	346^{++}
Typ B_2	-	11	86

Tabelle 4 Bestimmung der Antigenbindungskapazität normaler und dysgammaglobulinämischer Hühner nach der I. - III. Immunisierung mit Humanserumalbumin

Die Seren von je einem repräsentativen Tier einer jeden Gruppe wurden im Versuch getestet.

$^{+}$Interpolierter Wert

$^{++}$extrem hoher Wert

Folgende Ergebnisse erhielten wir:

a) Die Kontrolle wies nach der I. Immunisierung 46 mcgN/ml, nach der II. Immunisierung 267 mcgN/ml und nach der III. Immunisierung 214 mcgN/ml auf.

b) Bei Typ A_1 konnten keine antigenbindenden Antikörper nach der I., II. und III. Immunisierung nachgewiesen werden.

c) Bei Typ A_2 wurden nach der I. Immunisierung 24 mcgN/ml errechnet; nach der II. und III. Immunisierung wurden im Gammastrahlendetektor außer den unspezifischen[+] keine Impulse registriert.

d) Typ A_3 zeigte keine antigenbindenden Antikörper nach der I. Immunisierung. Nach der II. Immunisierung wurden weniger als 0,4 mcgN/ml und nach der III. Immunisierung 7 mcgN/ml nachgewiesen, wobei der erste Wert interpoliert war.

e) Bei Typ B_1 errechneten wir nach der I. Immunisierung 32 mcgN/ml, nach der II. Immunisierung 204 mcgN/ml und nach der III. Immunisierung 346 mcgN/ml. Der letzte Wert liegt extrem hoch.

f) Typ B_2 bildete keine Antikörper nach der I. Immunisierung, 11 mcgN/ml errechneten wir nach der II. Immunisierung und 86 mcgN/ml nach der III. Immunisierung.

4. Differenzierung der Antikörperaktivität enthaltenden Immunglobuline

Die spezifisch gebildeten Antikörper auf die I. - III. Immunisierung mit Humanserumalbumin wurden in der Radioimmunelektrophorese zum einen dargestellt und zum anderen als Immunglobulin G oder M identifiziert. Selbst kleinste Mengen spezifisch gebildeter Anti-

[+] siehe Material und Methoden

körper können dabei durch ihre Bindung an radioaktiv markiertes Antigen bei extrem langer Expositionszeit nachgewiesen und ihre Immunglobulinzugehörigkeit aufgezeigt werden.

Vergleicht man die charakteristischen bogenförmigen Präzipitate der Radioimmunelektrophorese mit dem zugehörigen autoradiographischen Bild, so zeigt sich, daß die spezifisch gebildeten Antikörper nahezu über den gesamten Präzipitationsbogen verteilt sind.

Die Aufschlüsselung der gebildeten Antikörper nach ihrer Immunglobulinzugehörigkeit zeigen für die verschiedenen Gruppen des Tiermaterials die in Tabelle 5 dargestellten Ergebnisse.

Wie aus Abbildung 1 - 9[+] zu ersehen ist, ergeben sich folgende radioimmunelektrophoretisch erfaßbare Reaktionsformen:

1. Bei den untersuchten Seren der Kontrolltiere war nach der I. Immunisierung sowohl die IgG- als auch die IgM-Linie deutlich markiert. Nach der II. und III. Immunisierung zeigte sich ausschließlich eine Markierung der IgG-Linie.

2. Typ A_1 : totaler Antikörpermangel nach der I., II. und II. Immunisierung.

3. Typ A_2 : ausschließlich nach der I. Immunisierung Markierung der IgM-Linie.

4. Typ A_3 : nach der I. Immunisierung keinerlei Markierung. Nach der II. und III. Immunisierung langsam stärker werdende Markierung der IgG-Linie.

[+] Die photographisch schlecht reproduzierbaren Radioimmunelektrophoresen wurden nach den Originalen skizziert. s. Seite 44 - 53

5. Typ B_1 : nach der I., II. und III. Immunisierung ausschließliche Markierung der IgG-Linie.

6. Typ B_2 : reagiert wie Typ A_3. Wobei die Autoradiographien der Tiere des Typs B_2 relativ stärkere Schwärzungen aufwiesen als die der Tiere von Typ A_3.

Tabelle 5

Tier	I. Immunisierung		II. Immunisierung		III. Immunisierung	
Ko	IgG	IgM	IgG	-	IgG	-
Typ A_1	-	-	-	-	-	-
Typ A_2	-	IgM	-	-	-	-
Typ A_3	-	-	(IgG)	-	IgG	-
Typ B_1	IgG	-	IgG	-	IgG	-
Typ B_2	-	-	IgG	-	IgG	-

Tabelle 5 Aufschlüsselung des reagierenden Immunglobulins normaler und dysgammaglobulinämischer Hühner nach der I. - III. Immunisierung mit Humanserumalbumin in der Radioimmunelektrophorese

Ko = Kontrolltiere

Typ A_1 - B_2 siehe Diskussion

IV. Diskussion

Die einleitend beschriebenen und in dieser Arbeit im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Bildung präzipitierender Antikörper untersuchten dysgammaglobulinämischen Hühner weisen ein Antikörpermangelsyndrom auf, das sich in verschiedener jeweils charakteristischer Weise auswirkt. Im Unterschied zu sämtlichen untersuchten Kontrolltieren, die nach der I., II. und III. Immunisierung hochgradig Antikörper bildeten und eine Beteiligung des Immunglobulins M nur nach der I. Immunisierung aufwiesen, zeigten sämtliche dysgammaglobulinämische Tiere mehr oder weniger starke Abweichungen davon:

1. Keinerlei Antikörperproduktion selbst nach dreimaliger Immunisierung

2. Ausschließlich nach Erstimmunisierung IgM- Antikörperbildung

3. Langsam ansteigende, von Minimaltitern ausgehende Antikörperproduktion mit Immunglobulin G

4. Hochgradige Antikörperbildung ausschließlich mit IgG auch nach Erstimmunisierung

Bevor näher auf die Ergebnisse eingegangen wird, werden die verwendeten Methoden diskutiert.

Von vornherein soll festgestellt werden, daß mit allen angewandten Methoden für jede der aufgetretenen Reaktionsformen weitgehend übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden.

Wie beschrieben, wurde die Dysgammaglobulinämie mit Hilfe der immunelektrophoretischen Analyse festgestellt. Diese Methode ist ein qualitatives Verfahren, gibt aber darüber hinaus eindeutige Anhaltspunkte über starke Quantitätveränderungen einzelner Serumproteine.

So konnten allein schon mit dieser Methode die Nachkommen dysgammaglobulinämischer Hühner in die zwei Typen A (IgG -, IgM +++) und B (IgG +, IgM +++) eingeteilt werden.

Zur Bestimmung der Immunglobulintiter wurde die einfache radiale Immundiffusion nach Mancini benutzt. Dabei können die Typen bezüglich der Immunglobulinquantitäten genauer bezeichnet werden

Typ A = IgG < 100 mg/100 ml+
IgM > 300 %+

Typ B = IgG 200 - 800 mg/100 ml
IgM > 300 %

Zum Vergleich die Normalwerte:

IgG ca. 1100 mg/100 ml
IgM ca. 150 %

Trotzdem stellt die immunelektrophoretische Analyse eine unerläßliche Voraussetzung für die Immunglobulinbestimmung dar.

1. Kann aus den immunelektrophoretischen Ergebnissen abgelesen werden, in welchen Verdünnungsstufen die einzelnen Seren in der einfachen radialen Immundiffusion zu untersuchen sind.

2. Wird durch die immunelektrophoretische Analyse verhindert, daß ein hochkonzentriertes Immunglobulin in der einfachen radialen Immundiffusion durch zu geringe Verdünnung gar nicht zur Darstellung kommt und fälschlicherweise negativ betrachtet wird.

+siehe einfache radiale Immundiffusion

Die zweidimensionale Immundiffusion nach Ouchterlony ermöglicht eine halbquantitative Bestimmung der präzipitierenden Antikörper. Ihr besonderer Vorteil liegt darin, daß innerhalb 20 Stunden nach der Blutentnahme ein vorläufiges Ergebnis zu sehen ist. Dies ist besonders wichtig, wenn bei negativen Resultaten sofortige weitere Blutentnahmen für die Untersuchungen erforderlich sind. So konnten bei den Nichtreagenten die Seren vom 4. - 12. Tag getestet werden; dadurch ließ es sich vermeiden, bei reagierenden Tieren unnötig Blut zu entnehmen.

Um das quantitative Antigenbindungsvermögen der einzelnen Versuchstiergruppen zu messen, wurde der ABC-Test angewandt. Obwohl keine vollständige Übereinstimmung zwischen präzipitierenden und antigenbindenden Antikörpern besteht, war doch eine gleichartige Reaktion zu erwarten. Dies wird durch die vorliegenden Ergebnisse auch bestätigt. Allerdings lag die antigenbindende Kapazität nach der I. Immunisierung weit unter den Werten aus dem ABC-Test, die nach der II. und III. Immunisierung gemessen wurden, obwohl die Ergebnisse aus dem Präzipitationstest zwischen den einzelnen Immunisierungen wenig differierten.

Zudem konnten im Serum der Typen A_3 und B_2, bei denen fragliche Reaktionen in der zweidimensionalen Immundiffusion nach der I. Immunisierung aufgetreten waren, keine antigenbindenden Antikörper im ABC-Test nachgewiesen werden.

Schließlich wurde noch die radioimmunelektrophoretische Analyse zur Differenzierung der Immunglobuline eingesetzt, die die spezifische Antikörperaktivität enthielten.

Einen Vergleichswert über die Menge des reagierenden Immunglobulins erhält man jedoch nur dann aus der Schwärzung, wenn man für alle Autoradiographien dieselbe Expositionszeit verwendet (siehe Material und Methoden). Die Seren, die in der zweidimensionalen Immundiffusion nach Ouchterlony keine oder zweifelhafte Antikörper aufwiesen, belichteten wir bei der Radioimmunelektrophorese extrem lang (bis zu acht Halbwertszeiten = 64 Tage), um auch minimalste Antikörpergehalte in den Seren der Versuchstiere zu erfassen. Die so gewonnenen Ergebnisse können - wenn sie positiv ausfielen - quantitativ nicht mit denen verglichen werden, die an Hand der festgelegten Expositionszeit erzielt wurden. Sie geben nur Aufschluß, ob überhaupt Antikörper gebildet wurden oder nicht.

Einige Autoradiographien sind aus dem oben genannten Grund zu schwach für eine photographische Reproduktion. Sie wurden deshalb nach dem Orginal skizziert. Vergleicht man die Ergebnisse aus Tabelle 3 und 4 mit denen aus Tabelle 5, so erhält man neben dem quantitativen auch ein qualitatives Bild der spezifisch gebildeten Antikörper nach der I., II. und III. Immunisierung mit Humanserumalbumin, einem löslichen Antigen, bei dysgammaglobulinämischen und normalen Hühnern.

1. Bei allen Kontrolltieren zeigte sowohl die IgG- als auch die IgM-Linie nach der I. Immunisierung eine starke Schwärzung, während nach der II. und III. Immunisierung nur die IgG-Linie markiert war.

2. Bei Typ A_1 konnte selbst nach dreimaliger Immunisierung keine Markierung einer der beiden Präzipitationslinien nachgewiesen werden.

3. Bei Typ A_2 wies die IgM-Linie ausschließlich nach der I. Immunisierung eine Schwärzung auf. Die IgG-Linie war nach keiner Immunisierung markiert.

4. Typ A_3 zeigt erst nach der II. Immunisierung eine geringgradige Markierung der IgG-Linie, die sich nach der III. Immunisierung verstärkt.

5. Bei Typ B_1 kann von der I. Immunisierung an eine starke Schwärzung der IgG-Linie alleine nachgewiesen werden.

6. Typ B_2 reagiert ähnlich wie Typ A_3. Hier ist die Schwärzung besonders nach der III. Immunisierung stärker als bei Typ A_3.

Die Ergebnisse der eben besprochenen Methoden führten somit zu den oben angegebenen Untergruppierungen der beiden Tierpopulationen mit anormalen Immunglobulin-Verhältnissen, also den Typen A und B.

Während die Kontrolltiere nach jeder Immunisierung mit einer starken Antikörperantwort reagierten, zeigten die dysgammaglobulinämischen Hühner unterschiedliche Reaktionsformen, die allerdings innerhalb der einzelnen Untergruppen wieder einheitlich sind.

Die Vielfalt der Reaktionsformen überrascht auf den ersten Blick. Doch sind aus der Literatur bekannte Ergebnisse bursektomierter Küken mit den vorliegenden vergleichbar (23, 9, 24). Aus histologischen Untersuchungen unserer dysgammaglobulinämischen Hühnerpopulation (11) geht hervor, daß hochgradige Hypoplasien der Bursa Fabricii beim Eintagsküken auftreten, und daß in den peripheren lymphatischen Geweben (Milz, Tonsilla caecalis) die bursaabhängigen Keimzentren fehlen und statt reifer Plasmazellen fast ausschließlich immunologisch unreife, große schwach pyroninophile Zellen vorliegen, die an die von Cruchaud et al (25) beschriebenen plasmoiden Zellen menschlicher Dysgammaglobulinämiker erinnern. Somit scheint die beim Huhn vorliegende erb-

liche Dysgammaglobulinämie von einer Störung der Bursafunktion abhängig zu sein.

Aus der Arbeit von Cooper et al (9) geht hervor, daß der Zeitpunkt der Bursaeliminierung von Bedeutung für die Entwicklung der Immunglobulin- und Antikörpersynthese ist. Je früher die Bursektomie durchgeführt wurde (17. Embryonaltag bis erste Lebenstage), desto hochgradiger war die Störung der humoralen Immunreaktion. Die Autoren schließen daraus, daß eine stufenweise Reifung des Immunsystems vor sich geht. Demnach liegt es nahe, die verschiedenen Reaktionsformen der Antikörperbildung auf den jeweiligen Zeitpunkt zurückzuführen, zu welchem die Bursa in ihrer Funktion gestört wurde. Somit könnten sowohl die unterschiedlichen Formen als auch der unterschiedliche Grad dieses Antikörpermangelsyndroms erklärt werden.

Zur möglichen Deutung der von Cooper et al (9) beschriebenen Dysgammaglobulinämien von Küken, die am ersten Lebenstag bursektomiert wurden, führen diese Autoren drei Möglichkeiten an:

1. Die Unterdrückung der 7 S^{+} - Immunglobulin- und Antikörper-Synthese läßt die Grundlage eines negativen Rückkopplungsmechanismus nicht zustande kommen, der normalerweise fähig ist, die 19 S^{++}-Immunglobulinbildung auszuschließen.

2. Die natürliche Fähigkeit zur 19 S-Immunglobulinbildung unter ausschließender Umwandlung in 7 S-Immunglobulin kann in einem dafür verantwortlichen Enzym oder einem genetischen Repressor- Depressor-Mechanismus liegen, der während der Entwicklung von einem Bursahormon aktiviert wird.
   Daß die 19 S-Antikörper von dysgammaglobulinämischer Küken gebildet werden, kann darauf beruhen, daß sich Vorläufer der Plasmazellen und Keimzentren zur Zeit der Bursektomie bereits in der Peripherie befanden.

$^{+}$IgG

$^{++}$IgM heute 17 S

3. Eine letzte Erklärungsmöglichkeit liegt darin, daß Tiere, die nicht in der Lage sind, auf eine Injektion mit 7 S-Antikörpern zu reagieren, diese immunologische Lücke mit ihrem verbliebenen Potential, d.h. mit 19 S-Immunglobulin, im Überschuß beantworten.

Diese Erklärungsmöglichkeiten können auch auf unseren Typ A bezogen werden. Da wir aber auch eine IgM-Vermehrung bei gleichzeitigem Vorliegen von subnormalen IgG-Konzentrationen feststellten (Typ B), muß zumindest ein unabdingbarer Rückkopplungsmechanismus in Frage gestellt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt scheint der letzte Erklärungsversuch der zitierten Autoren am naheliegendsten zu sein.

Das immunglobulinbildende System wird offensichtlich auf verschiedenen Ebenen der Differenzierung sowohl von exogenen als auch von endogenen Faktoren beeinflußt.

Wenn wir jetzt auf die in der Einleitung gestellten drei Fragen zurückkommen, können folgende Antworten gegeben werden:

1. Dysgammaglobulinämische Hühner zeigen ein hochgradiges Antikörpermangelsyndrom bezogen auf Humanserumalbumin. Zum Teil wird eine totale, zum Teil eine graduelle Unterdrückung der Antikörperbildung beobachtet.

2. Typ A und B der dysgammaglobulinämischen Hühner unterscheiden sich nicht grundsätzlich in ihrer Fähigkeit zur Antikörperbildung. Bei beiden Typen treten die beschriebenen Formen der Reaktionsweise auf.

3. Soweit dysgammaglobulinämische Tiere zur Antikörperbildung überhaupt in der Lage sind, bilden

sie überraschenderweise nur in ganz wenigen Fällen (Typ A_2) makroglobuläre Antikörper. (Entsprechend dem hohen IgM-Titer wäre zumindest auf den Reiz der I. Immunisierung hin eine solche Reaktion am ehesten zu erwarten gewesen.) In allen sonstigen Fällen, in denen es zu einer Antikörperbildung kam (Typ A_1, B_1 und B_2) wurden Antikörper vom IgG-Typ gebildet.

V. Zusammenfassung

Es wird über die Fähigkeit zur Bildung präzipitierender Antikörper gegen Humanserumalbumin durch die von Brüggeman et al (1) beschriebenen dysgammaglobulinämischen Hühner berichtet. Einleitend werden die Versuchstiere charakterisiert und verschiedenen Typen zugeordnet.

Als Typ A dieser Untersuchung werden die Hühner bezeichnet, die bei stark vermehrtem IgM kein oder kaum meßbares IgG im Serum aufweisen.

Typ B umfaßt solche Tiere, bei denen ein subnormaler IgG-Spiegel bei stark vermehrtem IgM nachgewiesen wurde.

Die Verschiedenartigkeit der Immunantworten nach dreimaliger Immunisierung mit Humanserumalbumin bei den Tieren dieser beiden Hauptgruppen erforderte eine Untergruppierung.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Alle Kontrolltiere bildeten mit den Immunglobulinen G und M nach der I. Immunisierung hochgradig Antikörper und nach der II. und III. Immunisierung ausschließlich mit IgG.

2. Typ A_1 ist trotz hohem IgM-Gehalt im Serum zu keinerlei Antikörperbildung fähig.

3. Typ A_2 kann nach der I. Immunisierung gut meßbare Antikörper zwar mit IgM bilden, jedoch gar keine nach der II. und III. Immunisierung.

4. Typ A_3 reagiert nach der I. Immunisierung zweifelhaft trotz hohem IgM-Titer und beginnt nach der II. Immunisierung mit einer gerade nachweisbaren IgG-Antikörperbildung, die nach der III. Immunisierung verstärkt wird.

5. Typ B_1 bildet nach der I. Immunisierung in gleicher Menge wie die Kontrolltiere Antikörper - allerdings nur mit IgG, obwohl hochgradig IgM vorhanden ist - und ebenso nach der II. und III. Immunisierung.

6. Typ B_2 reagiert ähnlich wie Typ A_3, nur bildet er nach der II. und III. Immunisierung etwas stärker Antikörper als Typ A_3.

Die Untersuchung der Antikörper-Antwort dysgammaglobulinämischer Hühner auf eine Immunisierung mit Humanserumalbumin ergab, daß alle Tiere eine vom normalen abweichende Reaktion aufwiesen. Es zeigt sich, daß die immunologische Antwort auf verschiedenen Ebenen gestört sein kann.

VI. Summary

This study is about the ability of dysgammaglobulinaemic chickens, as described by Brüggemann et al (1), to produce precipitating antibodies against human serum albumin. In the introduction the experimental animals are first characterized and classified.

The chickens defined as type A show no or hardly any measurable IgG in the serum, with a highly increased IgM-level.

All animals with a subnormal IgG-level and an increased IgM-level are defined as type B.

Due to the variations in the immunity reactions to three immunizations with human serum albumin within these two main groups, subgroups had to be made.

The results can be summarized as follows:

1. After the first immunization all control animals produced antibodies with IgG and IgM and after the second and third immunization only with IgG.

2. Type A_1 is not able to produce antibodies at all, although it has a high IgM-level in the serum.

3. Type A_2 is able to produce well measurable antibodies with IgM after the first immunization, but none at all after the second and third immunization.

4. Type A_3, although having a high IgM-level in the serum, shows dubious antibody-production after the first immunization and starts producing traces of IgG-antibodies after the second immunization, becoming more increased after the third immunization.

5. Type B_1 produces as many antibodies as the control animals after the first immunization, inspite of a high IgM-level, however, only with IgG; the same applies to the second and third immunization.

6. Type B_2 reacts similarly to type A_3, although it produces a little more antibodies after the second and third immunization.

The analysis of the antibody-reaction of dysgammaglobulinaemic chickens to an immunization with human serum albumin showed, that all animals reacted in deviation from the normal, and that the antibody reaction can be disturbed on various levels.

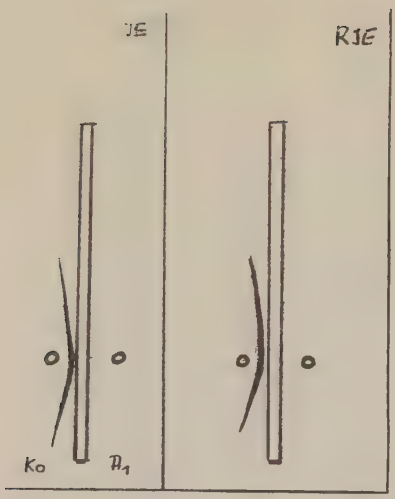

Bild 1 (Skizze)

Immunelektrophorese und Radioimmunelektrophorese nach der I. Immunisierung mit HSA des Serums eines Kontrolltieres und eines Tieres vom Typ A_1 gegen Anti-IgG.

Zu Bild 1 (Skizze):

In der Immunelektrophorese weist das Kontrolltier eine deutliche IgG-Präzipitationslinie auf, das Tier vom Typ A_1 bildet kein IgG-Präzipitat. Radioimmunelektrophoretisch ist die IgG-Linie des Kontrolltieres stark markiert, während beim Tier vom Typ A_1 keine Schwärzung auftritt.

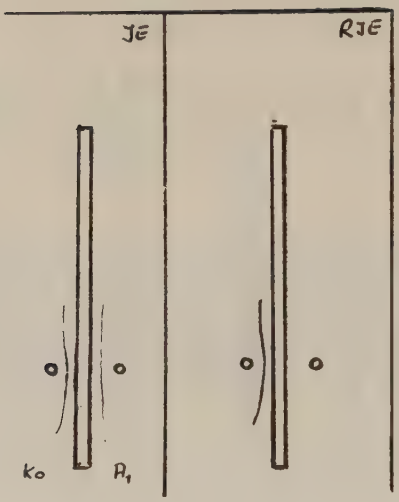

Bild 2 (Skizze)

Immunelektrophorese und Radioimmunelektrophorese nach der I. Immunisierung mit HSA des Serums eines Kontrolltieres und eines Tieres vom Typ A_1 gegen Anti-IgM.

Zu Bild 2 (Skizze):

In der Immunelektrophorese zeigen beide Tiere eine deutliche Präzipitationslinie; nur beim Kontrolltier ist in der Radioimmunelektrophorese die IgM-Linie gekennzeichnet. Das Tier vom Typ A_1 hat nach der I. Immunisierung keine Antikörper gegen HSA mit dem Immunglobulin M gebildet.

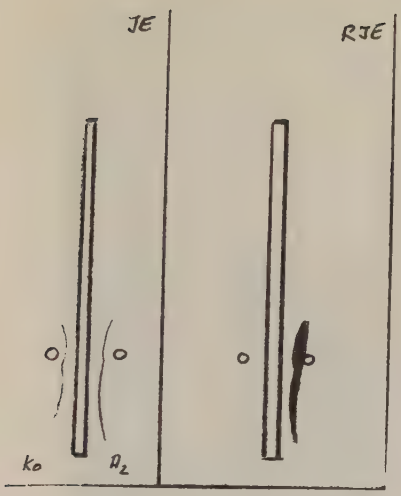

Bild 3 (Skizze)

Immunelektrophorese und Radioimmunelektrophorese nach der I. Immunisierung mit HSA des Serums eines Kontrolltieres und eines Tieres vom Typ A_2 gegen Anti-IgM

Zu Bild 3 (Skizze):

Die IgM-Präzipitationslinie des Tieres vom Typ A_2 ist in der Immunelektrophorese deutlich stärker als die des Kontrolltieres. In der Radioimmunelektrophorese weist das Tier vom Typ A_2 eine starke Antikörperaktivität im Immunglobulin-M-Präzipitat auf, während das Kontrolltier keine nachweisbaren Antikörper mit dem Immunglobulin M gegen HSA gebildet hat (siehe Diskussion S. 53).

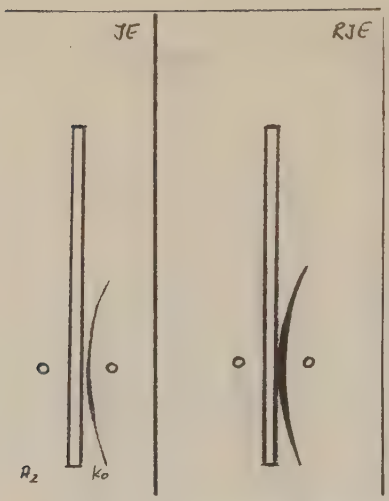

Bild 4 (Skizze)

Immunelektrophorese und Radioimmunelektrophorese nach der II. Immunisierung mit HSA des Serums eines Kontrolltieres und eines Tieres vom Typ A_2 gegen Anti-IgG

Zu Bild 4 (Skizze):

In der Immunelektrophorese zeigt sich beim Kontrolltier eine starke und beim Tier vom Typ A_2 keine IgG-Präzipitationslinie. In der Radioimmunelektrophorese weist die IgG-Präzipitationslinie des Kontrolltieres eine kräftige Schwärzung auf, während beim Tier vom Typ A_2 keine Markierung festzustellen ist.

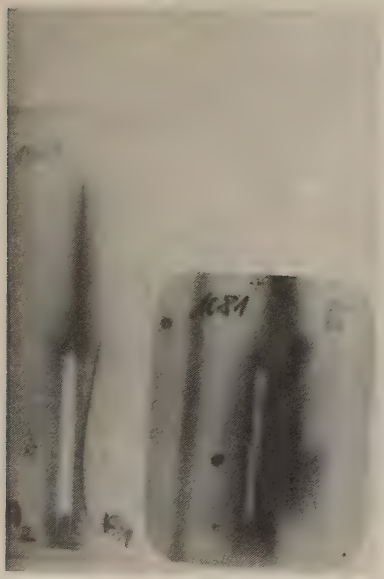

Bild 5 (Photographie)

Immunelektrophorese und Radioimmunelektrophorese nach der III. Immunisierung mit HSA des Serums eines Tieres vom Typ A_2 und eines Tieres vom Typ B_1 gegen Anti-IgG.

Zu Bild 5 (Photographie):

Das Tier vom Typ B_1 reagiert wie ein Kontrolltier. Es zeigt nach der III. Immunisierung in der Immunelektrophorese eine kräftige IgG-Präzipitationslinie und in der Radioimmunelektrophorese eine starke Markierung derselben. Beim Tier vom Typ A_2 ist nach der III. Immunisierung weder eine IgG-Präzipitationslinie in der Immunelektrophorese noch eine Schwärzung in der Radioimmunelektrophorese nachzuweisen.

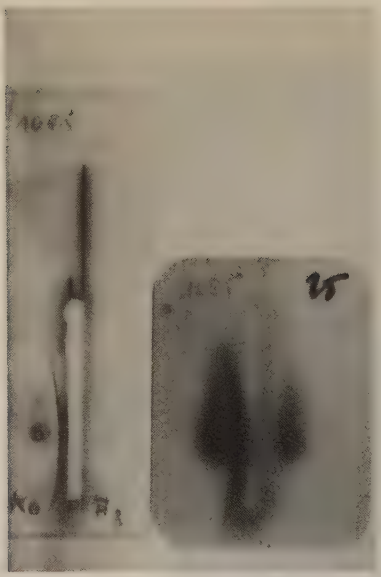

Bild 6 (Photographie)

Immunelektrophorese und Radioimmunelektrophorese nach der I. Immunisierung mit HSA des Serums eines Kontrolltieres und eines Tieres vom Typ A_3 gegen Anti-IgG.

Bild 7 (Photographie)

Immunelektrophorese und Radioimmunelektrophorese nach der II. Immunisierung mit HSA des Serums eines Kontrolltieres und eines Tieres vom Typ A_3 gegen Anti-IgG.

Bild 8 (Photographie)

Immunelektrophorese und Radioimmunelektrophorese nach der III. Immunisierung mit HSA des Serums eines Kontrolltieres und eines Tieres vom Typ A_3 gegen Anti-IgG.

Zu Bild 6, 7, 8 (Photographie):
Beim Kontrolltier ist die IgG-Präzipitationslinie in der Immunelektrophorese bei der I. - III. Immunisierung sehr stark gezeichnet und in der Radioimmunelektrophorese kräftig markiert.

Beim Tier vom Typ A_3 zeigt die Immunelektrophorese nach der I. Immunisierung (Bild 6) nur eine dünne IgG-Präzipitationslinie auf, die nach der II. Immunisierung (Bild 7) stärker und nach der III. Immunisierung (Bild 8) kräftig gezeichnet ist. In der Radioimmunelektrophorese sieht man bei diesem Tier nach der I. Immunisierung außer der unspezifischen keine Schwärzung, nach der II. Immunisierung ist eine schwache Markierung der IgG-Präzipitationslinie und nach der III. Immunisierung eine deutliche derselben zu erkennen.

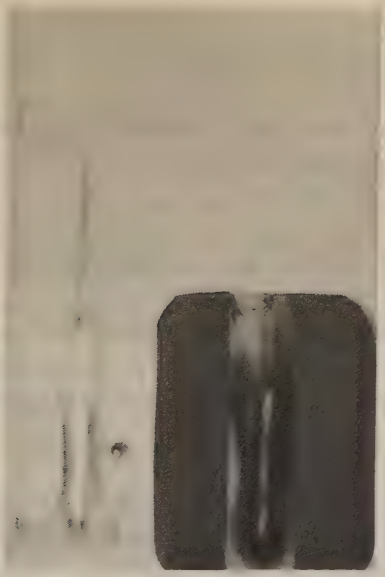

Bild 9 (Photographie)

Immunelektrophorese und Radioimmunelektrophorese nach der I. Immunisierung mit HSA des Serums eines Kontrolltieres und eines Tieres vom Typ B_1 gegen Anti-IgG.

Zu Bild 9 (Photographie):

Die IgG-Präzipitationslinie des Tieres vom Typ B_1 ist in der Immunelektrophorese deutlich schwächer als die des Kontrolltieres. In der Radioimmunelektrophorese können jedoch bei beiden Tieren annähernd gleiche Antikörper-Aktivitäten gegen HSA nachgewiesen werden.

L i t e r a t u r

1. Brüggemann, J., Merkenschlager, m., Kirchner, B., Lösch, U.
Eine erbliche Hypo- bzw. Dysgammaglobulinämie beim Haushuhn,
Naturwissenschaften 54, 97 (1967).

2. Rosen, F.S., Kery, S.V., Merter, E., Janeway, Ch.A. and
Gitlin, D.
Recurrant bacterial infections and dysgammaglobulinaemia
dificiency of 7 S-Gamma-Globulins in the presence of elevated
19 S Gamma-Globulins, Report of two cases Pediatrics 28, 182
(1961).

3. Dreesman, G., Benedict, A.A.
Properties of popain-digested chicken 7 S-Gammaglobulin
J. Immunol. 95, 855 (1965).

4. Pierce, A.E., Cubb, R.C., Long, P.L.
The Significance of the Bursa of Fabricius in relation to
the synthesis of 7 S and 19 S Immunglobulins and Specific
Antibody Activity in the fowl
Immunology 10, 321 (1966).

5. Tenenhouse, H.S., Deutsch, H.F.
Somme physical-chemical properties of chicken γ-globulins
and their pepsin and papain digestion products,
Immunochemmistry 3, 433 (1966).

6. Leslie, G.A. and Clem, L.V.
Phylogeny of Ig-structure, III. Immunglobulins of chicken,
J. Exp. Med. 30, 1337 (1969).

7. Warner, N.L. and Szenberg, A.
Effect of neonatal thymectomy on the immunresponse in the
chicken Nature 196, 784 (1962).

8. Ortega, L.G. and Der, K.B.
Studies of aggamaglobulinaemie induced by ablation of the bursa of Fabricius
Fed. proc. 24, 160 (1965)

9. Cooper, M.D., Peterson, R.D.A., South, M.A. and Good, R.A.
The functions of the Thymus system and the bursa system in the chicken
J. Exp. Med. 123, 75 (1966)

10. Merkenschlager, M., Riedel, G., Kirchner, B. und Lösch, U.
Die Immunglobuline bursektomierter Küken in der Immunelektrophorese (JE), Naturwissenschaften 53, 408 (1966)

11. Lösch, U., Friedrich, B., Hoffmann - Fezer
Zur Charakterisierung eines erblichen Immundefekts beim Haushuhn. Symposium über Fragen der Aufzucht von landwirtschaftlichen Nutztieren
Gießen 25.9.1970

12. Blazkovec, A.A. and Woolfe, H.R.
Factors Affecting the primary and secondary responses to Bovine Serum Albumin in chickens
Int. Arch. Allergy 26, 80 (1965)

13. Grabar, P., Williams, C.A.
Méthode permettant l'étude conjugeé des propriétes électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéins; application an sérum Sanguin
Biochim. biophys. Acta (Amst) 10, 193 (1953)

14. Scheidegger, J.J.
Une microméthode de l'immuno-élektrophorése
Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)

15. Mancini, G., Carbona, A.D. and Heremans, J.F.
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemnistry, 2, 235 (1965)

16. Gruber, F.
Studien zur Bestimmung der Immunglobulinspiegel am Beispiel normaler gnotobiotischer und konventionalisierter Küken
Inaugural-Dissertation aus dem Institut für Tierphysiologie der Universität München (1968)

17. Ouchterlony, O.
Acta Pathol. Microbiol. Seand. 25, 186 (1948)

18. Farr, R.S.
A quantitativ immunochemical measure of the primary interaction between J-BSA and Antibody
J. Inf. Dis. 103, 239 (1958)

19. Kallee, E.
Technische Kniffe bei Autoradiographien, Röntgen- und Laboratoriumspraxis XI, 127 (1958)

20. Schütte, H.R.
Radioaktive Isotope in der organischen Chemie und Biochemie
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße (1966)

21. Hiller-Jakob
Die Radio-Isotope. Urban und Schwarzenberg, München und Berlin (1952)

22. Broda, E.
Radioaktive Isotope in der Biochemie
Franz Deuticke, Wien (1958)

23. Rose, M.E., and Orlans, E.
Normal immune responses of bursaless chickens to a secondary antigenic stimulus
Nature 217, 231 (1968)

24. Markuanova, H., Hajek, P.
The influence of bursectomy and the thymectomy on the primary antibody formation to various antigens
Folia Microbiol. (Prag) 14, 171 (1969)

25. Cruchaud, A., Girard, J.P.
The site of synthesis of the 19 S gamma globulins in dysgamma-globulinaemie
J. Exp. Med. 115, 1141 (1962)

Lebenslauf

Als drittes Kind des Diplom-Landwirts Harald Schlüter und seiner Ehefrau Margarethe geb. Klein wurde ich, Wiebke Hartmann geb. Schlüter, am 27. November 1943 in Ludwigsburg geboren. Mein Vater fiel im Herbst 1943 als Leutnant der Luftwaffe.

Nach dem Besuch der Volksschule in Ludwigsburg-Hoheneck vom September 1950 an wechselte ich im Frühjahr 1954 zum Goethe-Gymnasium in Ludwigsburg über, wo ich am 28. Februar 1963 das Abitur bestand.

Ab dem Sommersemester 1963 studierte ich zwei Semester lang Biochemie in Tübingen und anschließend Pädagogik an der Pädagogischen Hochschule Stuttgart, wo ich im März 1966 mit der 1. Prüfung für das Lehramt an Volksschulen abschloß. Danach studierte ich neun Semester Tiermedizin an der Universität München, wo ich im Januar 1971 das Staatsexamen ablegte. Zur Anfertigung meiner vorliegenden Dissertation arbeitete ich vom Mai 1968 bis Oktober 1970 im Institut für Tierphysiologie der Universität München.

Seit Mai 1970 bin ich mit dem Landrat des Kreises Ludwigsburg, Dr. Ulrich Hartmann, verheiratet.